

## NOVAS ABORDAGENS PARA DESENVOLVIMENTO DE UMA VACINA PARA LEPTOSPIROSE ANIMAL

**AMILTON CLAIR PINTO SEIXAS NETO<sup>1</sup>; MARCO ALBERTO MEDEIROS<sup>2</sup>;  
KARINA COLONETTI<sup>1</sup>; SAMUEL RODRIGUES FELIX<sup>3</sup>; ÉVERTON FAGONDE  
DA SILVA<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas, PPGB- [amiltonseixas@gmail.com](mailto:amiltonseixas@gmail.com)

<sup>2</sup>Fundação Oswaldo Cruz, BioManguinhos

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas, PPGV – [efsilva@ufpel.edu.br](mailto:efsilva@ufpel.edu.br)

### 1. INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma doença emergente negligenciada no mundo. É uma zoonose causada por espiroquetas patogênicas do gênero *Leptospira*, encontrada comumente em áreas tropicais e subtropicais (ADLER E DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010). Nos últimos anos, a leptospirose tem sido considerada um problema global de saúde pública, devido ao aumento nas taxas de mortalidade e de morbidade (GANOZA et al. 2010). A transmissão da leptospirose ocorre pela exposição à água ou solo contaminado pela urina de animais infectados ou por contato direto com esses animais. No hospedeiro as leptospirosas patogênicas podem causar desde sintomas leves até manifestações mais severas, podendo levar à morte (FAINE et al., 1999).

Devido às perdas econômicas causadas pela doença e os prejuízos em termos de saúde pública, se faz necessário o uso de vacinas em animais. Deste modo, o desenvolvimento de novas abordagens para a prevenção da leptospirose torna-se indispensável. Atualmente, as vacinas disponíveis são constituídas de células inteiras inativadas, chamadas bacterinas, ou preparados da membrana de leptospirosas patogênicas, as quais induzem imunidade sorovar-específica e pouco duradoura, além de reações adversas. Dessa forma, não proporcionam proteção cruzada contra os diferentes sorovares que podem causar a leptospirose (FAINE et al. 1999). Diante dessa limitação, o desenvolvimento de uma vacina multi-sorovar, que gere proteção cruzada contra os diferentes sorovares de *Leptospira*, ainda representa um grande desafio (DELLAGOSTIN et al., 2011).

As proteínas LigA e LigB apresentaram resultados promissores em experimentos de imunoproteção em modelo animal (KOIZUMI; WATANABE, 2004; SILVA et al., 2007). Estas proteínas são altamente conservadas, estão presentes somente em cepas patogênicas, reconhecidas pelo soro de pacientes com leptospirose e ligam-se aos componentes da matriz extracelular. Além disso, até o momento, a vacina que apresentou o melhor resultado foi uma vacina de subunidade com LigANi 625-1224aa, a qual conferiu um nível de proteção de 100% em modelo hamster, utilizando adjuvante oleoso (SILVA et al., 2007).

Assim, o objetivo desse estudo foi avaliar preparações vacinais com as proteínas recombinantes LigANi 625-1224aa e LigB131-649aa combinadas e com LigA 131-1224aa, uma preparação com a proteína LigA inteira, as quais foram purificadas e formuladas com o adjuvante hidróxido de alumínio, a fim de identificar qual(is) formulação(ões) induz(em) uma resposta protetora homóloga em hamster.

### 2. MATERIAL E MÉTODOS

- **Cepa e Cultivo.** *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni cepa Fiocruz L1-130 foi crescida em meio EMJH (Difco) enriquecido com 10% de suplemento comercial (Difco). Todas as transformações em *E. coli* foram feitas nas cepas TOP10F ou BL21(DE3), cultivadas seguindo procedimentos padrões.

- **Animais.** Hamsters (*Mesocricetus auratus*) machos com 4 semanas de idade foram utilizadas como modelo animal para todos os experimentos. Todos os animais foram pesados no início do experimento e mantidos em caixas com as dimensões de 49x34x16cm, totalizando 1.666 cm<sup>2</sup>, conforme é recomendado para hamsters (LAPCHIK et al., 2010). Após o desafio, os animais foram alojados em estantes ventiladas com umidade e temperatura controladas, programa de luz e alimentação recomendados.

- **Expressão e purificação das proteínas LigA 625-1224aa, LigA 131-1224aa e LigB 131-649aa em biorreator.** Com o intuito de melhorar o rendimento das proteínas recombinantes e consequentemente determinar as melhores condições de cultivo, foi feito o crescimento bacteriano em biorreator Biopod f800 (Fogale Nanotech) com capacidade de até 80 mL e BioFlo®(New Brunswick). Os cultivos celulares crescidos em biorreator foram lisados e as proteínas recombinantes expressas foram purificadas através do equipamento AKTA Purifier 10 (GE Healthcare) por HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*), através do método de purificação por afinidade usando colunas modelo Histrap HP (GE Healthcare). As proteínas purificadas foram dessalinizadas e aplicadas em coluna de troca iônica a fim de aumentar o grau homogeneidade e reduzir a quantidade de LPS nas amostras. As proteínas recombinantes foram quantificadas pelo método de BCA. A seguir, as proteínas foram formuladas em adjuvante na proporção de 200µg de proteína para 2mg de hidróxido de alumínio (Alhydrogel, Brenntag Biosector, 216145-51-2) por mL de PBS (pH 7,2). Em seguida, o material foi estocado a 4°C até o momento da inoculação dos animais. Essa etapa de expressão, purificação e antigenicidade foi realizada em BioManguinhos pela equipe do Dr. Marco Medeiros.

- **Ensaio de imunoproteção, aspectos éticos e análise estatística.** Para os ensaios de imunoproteção, de acordo com a disponibilidade de animais, os hamsters foram divididos em grupos conforme a Tabela 1, sendo imunizados com duas doses, por via intramuscular, com 60ug de proteína e 10<sup>8</sup> leptospiras (bacterina). Os animais foram desafiados com 500 e 1000 *L. interrogans* sorovar Copenhageni.

**Tabela 1. Distribuição dos animais no ensaio de imunoproteção**

Grupos	Exp.1	Exp.2
LigA 131-1224aa	6	5
LigA 625-1224aa	6	NR
LigA 625-1224aa + LigB131-649aa	6	5
LigB 131- 649aa	6	NR
Adjuvante (controle -)	8	5
Bacterina (controle +)	8	NR
Dose de desafio	1000	500

Legenda: NR=não realizado

Este estudo foi submetido a aprovação pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da UFPel, obtendo o parecer favorável (CEEA 5238). Os animais utilizados neste projeto foram tratados de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, recomendados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e de acordo com a legislação vigente. O laboratório de Biologia Molecular (CDTec) possui Certificado de Qualidade em Biossegurança nº0081/98. Todas as análises estatísticas e os gráficos de sobrevivência foram realizados no programa *Prisma 4 for Windows* versão 4.03. O *Fisher's Test* foi utilizado para a análise de mortalidade, disponível em: <http://www.langsrud.com/stat/fisher.htm>.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

A vacinação dos hamsters contendo as preparações com LigA 625-1224aa, LigA 131-1224aa e LigB 131-649aa, e bacterina (controle positivo) conferiram níveis de proteção variáveis (16,6-100%) nos hamsters contra o desafio homólogo com dose letal. Por outro lado, nenhum animal sobreviveu no grupo controle negativo (adjuvante hidróxido de alumínio) (Tabela 2).

Ao realizar-se a análise da mortalidade usando o *Fisher's test*, comparando-se com o grupo controle negativo, a proteção conferida com significância estatística foi obtida com duas doses de  $10^8$  leptospiras para o grupo bacterina no Exp.1, e com duas doses de 60µg de proteína recombinante nos grupos LigA 625-1224aa e LigA 625-1224aa + LigB131-649aa no Exp.1, e LigA 625-1224aa + LigB131-649aa no Exp.2 (Tabela 2). Na análise de sobrevivência através do *Logrank test*, todos os grupos vacinais e bacterina conferiram proteção com significância estatística aos animais ( $p < 0,05$ ), quando comparados com o grupo controle (Figura 1).

**Tabela 2. Análise de mortalidade dos ensaios de imunoproteção**

Grupos	Exp.1	%	Exp.2	%
LigA 131-1224aa	5/6	83,4	4/5	80,0
LigA 625-1224aa	1/6	16,6 <sup>a</sup>	NR	NR
LigA 625-1224aa + LigB131-649aa	2/6	33,3 <sup>a</sup>	0/5	0 <sup>a</sup>
LigB 131- 649aa	4/6	66,6	NR	NR
Adjuvante (controle -)	8/8	100	5	100
Bacterina (controle +)	0/8	0 <sup>a</sup>	NR	NR
Dose de desafio	1000		500	

Legenda: <sup>(a)</sup> proteção estatisticamente significativa  $p < 0,01$ , quando a mortalidade foi comparada com o grupo controle negativo (hidróxido de alumínio) no *Fisher's Test*. NR=não realizado.

Até o momento, os estudos que utilizaram vacinas recombinantes, a vacina que apresentou o melhor resultado foi uma vacina de subunidade com LigANi 625-1224aa, a qual conferiu um nível de proteção de 100% em hamsters fêmeas, utilizando adjuvante oleoso (SILVA et al., 2007). Em nosso estudo, obtivemos resultados promissores quando utilizamos as proteínas recombinantes LigANi 625-1224aa e LigB 131-649aa combinadas e formuladas com o adjuvante Hidróxido de alumínio, um adjuvante aceito para o uso em humanos e animais. Além disso, os resultados foram obtidos em hamsters machos, animais que

apresentam uma suscetibilidade comprovadamente maior a infecção por leptospiros do que as fêmeas hamsters (SILVA et al., 2008).

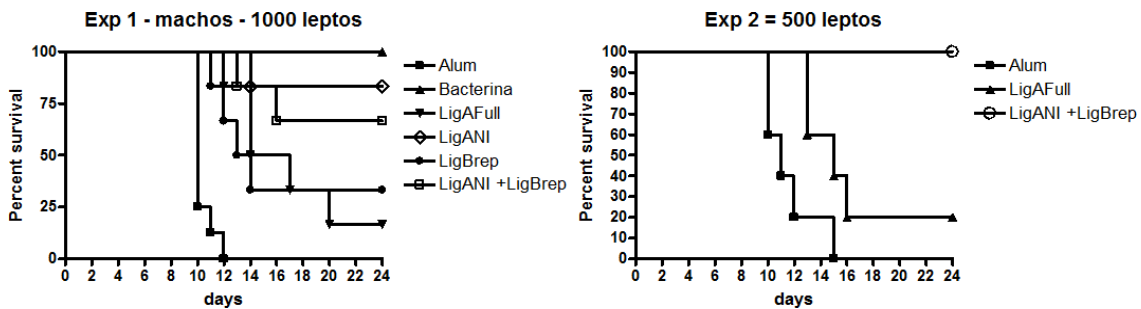


Figura 1. Análise de sobrevivência dos ensaios de imunoproteção.

#### 4. CONCLUSÕES

As proteínas recombinantes LigANI 625-1224aa e LigB 131-649aa combinadas e formuladas com o adjuvante hidróxido de alumínio induzem uma resposta protetora homóloga em hamsters. Por outro lado, as preparação com a proteína LigA inteira (LigA 131-1224aa) e LigB 131-649aa conferem sobrevida a infecção por leptospiros.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADLER, B.; de La PEÑA MOCTEZUMA, A. *Leptospira and leptospirosis*. **Veterinary Microbiology**, Volume 140, p. 287-296, 2010.
- DELLAGOSTIN, O.A.; GRASSMANN, A.A.; MCBRIDE, A.J. Recombinant vaccines against Leptospirosis. **Human Vaccines**, v. 7, n. 11, p. 1215-1224, 2011.
- FAINE, S. B.; ADLER, B.; BOLIN, C.; PEROLAT, P. *Leptospira and Leptospirosis*. **MediSci**: Melbourne, 272p, 1999.
- GANOZA, C.; MATTHIAS, MA.; VINETZ, JM. Asymptomatic Renal Colonization of Humans in the Peruvian Amazon by *Leptospira*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, Peru, Volume 4, 2010.
- LAPCHIK, V.; MATTARAIA, V.; KO, G. **Cuidados e manejo de animais de laboratório**. São Paulo: Atheneu, c2010.
- KOIZUMI, N.; WATANABE, H. Leptospiral immunoglobulin-like proteins elicit protective immunity. **Vaccine**, v.22, n.11-12, p.1545-1552, 2004.
- SILVA, E. F.; MEDEIROS, M. A.; KO, A. I. The terminal portion of leptospiral immunoglobulin-like protein LigA confers protective immunity against lethal infection in the hamster model of leptospirosis. **Vaccine**, v.25, n.33, p.6277-6286, 2007.
- SILVA, E. F.; SANTOS, C. S.; DELLAGOSTIN, O. A.; KO, A. I. Characterization of virulence of *Leptospira* isolates in a hamster model. **Vaccine**, v.26, n.31, p.3892-3896, 2008.